

SUSTAINED-RELEASE COMPOSITION OF DRUGS ENCAPSULATED IN MICROPARTICLES OF HYALURONIC ACID**Patent number:** JP11513047T**Publication date:** 1999-11-09**Inventor:****Applicant:****Classification:****- international:** A61K9/16; A61K9/16; (IPC1-7): A61K47/38; A61K9/08; A61K9/12; A61K38/00; A61K38/21; A61K38/22; A61K38/27; A61K38/28**- european:** A61K9/16H6F**Application number:** JP19980541488T 19980326**Priority number(s):** WO1998KR00062 19980326; KR19970012046 19970401**Also published as:** WO9843664 (A1)
 EP0918535 (A1)
 KR236771 (B1)
 BR9804802 (A)
 EP0918535 (B1)

more >>

AP

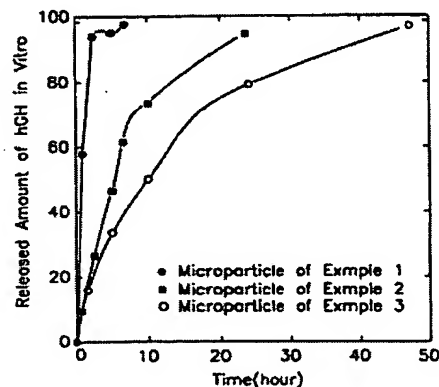
BEST AVAILABLE COPY

Report a data error here

Abstract not available for JP11513047T

Abstract of corresponding document: WO9843664

A sustained-release drug composition comprises microparticles of hyaluronic acid or an inorganic salt thereof and a protein or peptide drug encased in said microparticles, wherein the average size of said microparticles ranges from 0.1 to 40 μ m.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平11-513047

(43) 公表日 平成11年(1999)11月9日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

A 6 1 K 47/36

A 6 1 K 47/36

C

9/08

9/08

F

9/12

9/12

L

38/00

37/36

38/21

37/02

審査請求 有

予備審査請求 未請求(全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-541488

(86) (22) 出願日 平成10年(1998)3月26日

(85) 翻訳文提出日 平成10年(1998)11月30日

(86) 国際出願番号 PCT/KR98/00062

(87) 国際公開番号 WO98/43664

(87) 国際公開日 平成10年(1998)10月8日

(31) 優先権主張番号 1997/12046

(32) 優先日 1997年4月1日

(33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, BG, BR, CA, CN, HU, ID, IL, JP, MX, NZ, PL, SG, TR, US

(71) 出願人 株式会社エルジ化学

大韓民国ソウル市ヨンドンボク、ヨイドドン20

(72) 発明者 キム, ミュン・ジン

大韓民国305-340デジョン、ユソング、ドリョンドン381-42番、エルジ・アパートメント6-104

(72) 発明者 キム, スン・ジン

大韓民国143-190ソウル、カンジニング、ジャヤンドン662-2番

(74) 代理人 弁理士 青山 稔 (外2名)

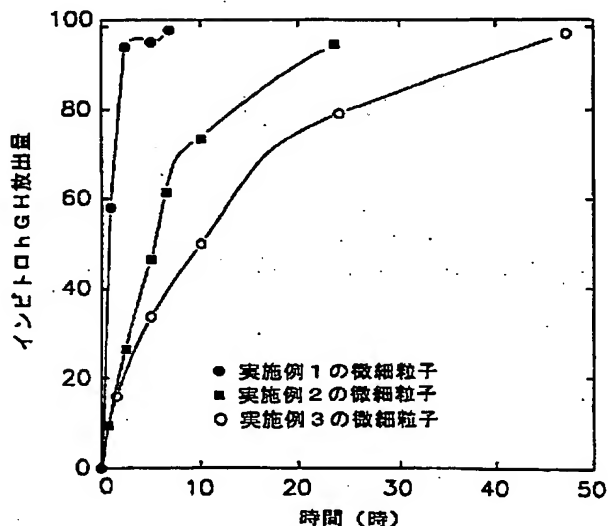
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒアルロン酸の微細粒子中に封入された薬物の徐放性組成物

(57) 【要約】

ヒアルロン酸またはその無機塩の微細粒子および前記微細粒子中に封入されたタンパク質またはペプチド薬物を含む徐放性薬物組成物であって、前記微細粒子の平均粒径が0.1ないし40 μ m範囲である組成物。

図 1



【特許請求の範囲】

1. ヒアルロン酸またはその無機塩の微細粒子および前記微細粒子中に封入されたタンパク質またはペプチド薬物を含む徐放性薬物組成物であって、前記微細粒子の平均粒径が0.1ないし40 μ m範囲である組成物。

2. 安定剤をさらに含む請求項1に記載の組成物。

3. 前記微細粒子の平均粒径が1ないし10 μ mである請求項1に記載の組成物。

4. 前記薬物が、ヒト成長ホルモン、ウシ成長ホルモン、ブタ成長ホルモン、成長ホルモン放出ホルモン、成長ホルモン放出ペプチド、顆粒球-コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージ-コロニー刺激因子、マクロファージ-コロニー刺激因子、エリスロポエチン、骨格形態発生タンパク質、インターフェロン、インスリン、アトリオペプチン-III、モノクローナル抗体、腫瘍壊死因子、マクロファージ活性化因子、インターロイキン、腫瘍変性因子、インスリン-類似成長因子、表皮成長因子、組織プラスミノゲンアクチベーターおよびウロキナーゼからなる群から選ばれることを特徴とする請求項1に記載の組成物。

5. 前記ヒアルロン酸の無機塩が、ヒアルロン酸のナトリウム、カリウム、リチウム、カルシウム、アンモニウム、マグネシウム、亜鉛、銅およびコバルトの塩からなる群から選ばれることを特徴とする請求項1に記載の組成物。

6. 前記安定剤が、多糖類、タンパク質、アミノ酸、脂質、脂肪酸、ポリエチレングリコール、無機塩、界面活性剤およびこれらの混合物からなる群から選ばれることを特徴とする請求項2に記載の組成物。

7. 請求項1の徐放性組成物を注射剤用媒体に分散した注射剤。

8. 分散剤または防腐剤をさらに含む請求項7に記載の注射剤。

9. 前記注射剤用媒体が、緩衝水溶液、エタノール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、ミネラル油、スクアレン、たら肝油、モノ-、ジ-、およびトリ-グリセリド、およびこれらの混合物からなる群から選ばれることを特徴とする請求項7に記載の注射剤。

10. 前記植物油が、トウモロコシ油、オリーブ油、大豆油、紅花油、綿実油

落花生油、胡麻油、ココナツ油、ヒマシ油およびこれらの混合物からなる群から選ばれることを特徴とする請求項9に記載の注射剤。

11. 請求項1の徐放性組成物を含むエアロゾル製剤。

【発明の詳細な説明】

ヒアルロン酸の微細粒子中に封入された薬物の徐放性組成物

発明の分野

本発明は、ヒアルロン酸またはその塩の固体微細粒子中に封入されたタンパク質またはペプチド薬物の徐放性組成物およびそれを含む注射剤形に関する。

発明の背景

タンパク質またはペプチド薬物は経口投与すると吸収が遅いため、通常注射によって投与される。一回の注射投与による薬物の体内における活性維持期間が短いため、長期間の治療が必要な場合にはこれらの薬物を繰返して継続的に注射投与しなければならない。たとえば、脳下垂体欠乏性矮小症の小児を治療するためには、組換えヒト成長ホルモンを6ヶ月以上毎日注射しなければならない。したがって、このような連日投与の不便を解消できる徐放性剤形の開発が要求されている。

ヒト成長ホルモンのようなタンパク質またはペプチド薬物の徐放性剤形は、体内で徐々に加水分解する生分解性高分子マトリックス物質の微細粒子中に薬物を封入することによって製造される。このような観点から、徐放性薬剤用に適合な生分解性高分子の開発研究が活発に行われ、その結果、ポリラクチド、ポリグリコリド、ポリ(ラクチド-コグリコリド)、ポリ-オルトエステルおよびポリアンヒドリド (polyanhydride) のような生分解性ポリエステルが上記の用途に効果的であることが明らかになった (M. Chasin & R. Langer, et al., *Biodegradable Polymers as Drug Delivery System*, Marcel Dekker, (1990); J. Heller, *Adv. Drug Del. Rev.*, 10, 163 (1993))。

また、ゼラチン、コラーゲン、キトサン、カルボキシメチルセルロース、アルギネートおよびヒアルロン酸のような天然高分子物質を用いる徐放性薬剤の開発研究も進まれている。一般に、これらの天然高分子は、水の存在の下でゲルを形成し、このような高粘度で非常に低い薬物拡散速度を有するゲル型のマトリックスが徐放性薬物組成物の製造に用いられる。

たとえば、米国特許出願第5,416,017号は、0.01ないし3%のヒ

アルロン酸を含むゲルを用いたエリスロポエチン (erythropoietin) の徐放性注射剤を開示しており、日本特開平1-287041号は、1%のヒアルロン酸で製造されたゲルを用いたインスリンの徐放性注射剤を記述しており、また日本特開平2-00213号は、5%のヒアルロン酸を含むゲルを用いたカルシトニン、エルカノニンまたはヒト成長ホルモンの徐放性剤形を記述している。同様に、メイヤーらは0.5ないし4%のヒアルロン酸を含むゲルを用いた顆粒球コロニー刺激因子の徐放性剤形を報告した (James Meyer, et al., J. Controlled Rel., 35, 67 (1995))。

しかし、数%濃度のヒアルロン酸を含むゲルは 10^7 センチポイズ程度の高い粘度を有するため、このような剤形を注射投与する場合大きい口径の注射針を用いなければならない。さらに、人体に投与されたゲルは体液によって希釈されることによって薬物の保留性を容易に失うので、薬物の放出が1日以上持続しない。たとえば、日本特開平1-287041号は、1%のヒアルロン酸を含むインスリンの徐放性注射剤をウサギに注射した場合、グルコースの血中濃度を低下させる治療効果が24時間以上持続しないことを記述している。また、顆粒球コロニー刺激因子を含有する2%のヒアルロン酸剤形 (James Meyer, et al., J. Controlled Rel., 35, 67 (1995)) またはインターフェロナー α および血漿タンパク質を含有する1.5%のヒアルロン酸剤形 (米国特許第5, 416, 017号) を実験動物に投与した場合、血中薬物濃度が24時間以内に初期濃度の $1/10$ 以下に急激に落ちることを報告した。すなわち、ヒアルロン酸ゲルの徐放性薬剤は薬物の放出が24時間以上持続しないという短所を有する。

天然ヒアルロン酸またはその無機塩は水にのみ溶解する。一方、ヒアルロン酸-ベンジルエステルHYAFFTMは水に溶けないが、ジメチルスルホキシドのような有機溶媒に溶ける。前記疎水性ヒアルロン酸誘導体およびこれに薬物の固体微細粒子を封入した薬物組成物は通常のエマルジョン溶媒抽出法で製造される (N. S. Nightlinger, et al., proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., 22nd, Paper No. 3205 (1995); L. Ilum, et al., J. Controlled Rel., 29, 133 (1994))。この方法を簡単に説明する

と、タンパク質薬物粒子をヒアルロン酸－ベンジルエステルのジメチルスルホキシド溶液に分散し、得られた分散液をミネラル油に加えてエマルジョンを形成させる。このエマルジョンに酢酸エチルのような有機溶媒を加えてジメチルスルホキシドを抽出して薬物およびヒアルロン酸－ベンジルエステルで構成された微細粒子を得る。

しかし、前記方法は、タンパク質薬物が有機溶媒または疎水性ヒアルロン酸ベンジルエステルと接触することによって変性するという問題を有する。実際に、完全にエステル化されたヒアルロン酸誘導体を用いて製造した顆粒球コロニー刺激因子の微細粒子剤形は、初めの数日間顆粒球コロニー刺激因子含有量の25%が放出されるのみで、その後17日間は全然放出されないと報告された(N. S. Nightlinger, et al., proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., 22nd, Paper No. 3205 (1995))。この場合、タンパク質薬物の大部分が損失されたが、ヒアルロン酸－ベンジルエステルおよび／または有機溶媒との相互作用によって変性された可能性が高い。

発明の要約

したがって、本発明の目的は、タンパク質またはペプチド薬物の改善された徐放性剤形を提供することである。

本発明の他の目的は、ヒアルロン酸またはこれらの無機塩の微細粒子および前記微細粒子中に封入されたタンパク質またはペプチド薬物を含む徐放性薬物組成物を提供することであり、ここで、前記微細粒子の平均粒径は0.1ないし40 μm 範囲である。

図面の簡単な説明

本発明の前記および他の目的および特色は、下記の図面を伴う本発明の説明によって明らかになる。

図1は、ヒト成長ホルモン(hGH)の体外溶出量の経時変化を示し、

図2Aおよび2Bは、本発明のhGHを含む徐放性組成物の薬物安定性を逆相高性能液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)を用いて観察した結果であり(a: 本発明の剤形から溶出されたhGH; およびb: hGH水溶液の対照群)、

図3Aおよび3Bは、本発明のhGHを含む徐放性組成物の薬物安定性をサイ

ズ排除クロマトグラフィー (SEC) を用いて観察した結果であり (A: 本発明の剤形から溶出された hGH; および B: hGH 水溶液の対照群)、

図4は、ヒト成長ホルモンを含む本発明の徐放性剤形および通常の剤形で処理した矮小ラットの平均体重増加の経時変化を比べたものであり、

図5は、ヒト成長ホルモンを含む本発明の徐放性剤形および通常の剤形で処理した矮小ラットの平均体重増加の経時変化を比べたものであり、

図6は、血中ヒト成長ホルモン濃度の経時変化を示したものであり; および

図7は、ヒト成長ホルモンを含む本発明の徐放性剤形および通常の剤形で処理した矮小ラットの平均体重増加の経時変化を比べたものである。

発明の詳細な説明

本発明の徐放性組成物は、ヒアルロン酸またはその塩の固体微細粒子および前記粒子中に封入されたタンパク質またはペプチド薬物を含む。本発明の組成物は、既存のヒアルロン酸ゲルを用いた剤形より薬物の放出持続期間が長く、また取扱いやすい。すなわち、本発明の微細粒子組成物を用いて製造した注射剤形は低い粘度を有するため投与しやすく、生体内で薬物を長期間に亘って一定な速度で放出する。

また、本発明の組成物は組成物から薬物が100%放出されるまで薬物が変性しないという長所を有する。

0.1ないし40 μm 、好ましくは1ないし10 μm の平均粒径を有する本発明の微細粒子組成物は、タンパク質またはペプチド薬物およびヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液を噴霧乾燥または凍結乾燥することによって製造し得る。必要に応じて溶液に安定剤を加え得る。

本発明の固体微細粒子組成物の製造に使用され得る薬物としては、ヒト成長ホルモン、ウシ成長ホルモン、ブタ成長ホルモン、成長ホルモン放出ホルモン、成長ホルモン放出ペプチド、顆粒球-コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージ-コロニー刺激因子、マクロファージ-コロニー刺激因子、エリスロポエチン、骨格形態発生タンパク質、インターフェロン、インスリン、アトリオペプチン-II I、モノクローナル抗体、腫瘍壊死因子 (TNF)、マクロファージ活性化因子、インターロイキン、腫瘍変性因子、インスリン-類似成長因子、表皮成長因子

、組

織プラスミノゲンアクチベーターおよびウロキナーゼなどがある。

本発明の固体微細粒子組成物の製造に使用され得るヒアルロン酸の代表的な無機塩には、ナトリウム、カリウム、リチウム、カルシウム、アンモニウム、マグネシウム、亜鉛、銅およびコバルト塩が含まれる。

本発明に使用され得る安定剤としては、炭水化物、タンパク質、アミノ酸、脂質、脂肪酸、ポリエチレングリコール、無機塩および界面活性剤がある。

本発明の微細粒子徐放性組成物は組成物の総量を基準として1ないし90重量%のタンパク質またはペプチド薬物を含み、また、選択的に組成物の総量を基準として1ないし90重量%の安定剤を含み得る。

本発明の徐放性注射剤は、注射剤用媒体に注射剤の総量を基準として0.01ないし10重量%の本発明の微細粒子徐放性組成物を分散することによって製造できる。必要に応じてこれに分散剤または防腐剤をさらに加え得る。本発明の注射剤に使用され得る一般的な注射剤用媒体としては、緩衝水溶液、エタノール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、ミネラル油、スクアレン、たら肝油、モノー、ジー、およびトリグリセリド、またはこれらの混合物がある。

植物油の例としては、トウモロコシ油、オリーブ油、大豆油、紅花油、綿実油、落花生油、胡麻油およびこれらの混合物がある。

また、本発明の微細粒子徐放性組成物を含むエアロゾル剤を製造し得る。このように製造した本発明のエアロゾル剤は、微細粒子組成物が鼻粘膜や気管支粘膜を通じて薬物を調節放出するように適用され得る。

以下、本発明を下記実施例および試験例は本発明を例示するのみであり、本発明の範囲を制限しない。

実施例1：微細粒子の製造

ヒト成長ホルモン (hGH) 2 mg/ml を含有する 5 mM リン酸塩緩衝溶液 (PBS) にツイーン 80 を 0.01 重量% の濃度で加えた。これに、分子量 1,000,000 のヒアルロン酸ナトリウムを 2 mg/ml の濃度で加えた。得

られた溶液を3 ml / 分の流速で噴霧乾燥機 (Buchi 190) に供給して微細粒子を製造した。この際、噴霧乾燥機に流入される乾燥空気の温度は85℃であった。

得られた微細粒子の平均粒径は3.0 μ mであった。

実施例2：微細粒子の製造

ヒト成長ホルモン (hGH) 1 mg / ml を含有する5 mM PBS に Tween 80 を0.01重量%の濃度で加えた。これに、分子量2,000,000のヒアルロン酸ナトリウムを1 mg / ml の濃度で加えた。得られた溶液を2 ml / 分の流速で噴霧乾燥機 (Buchi 190) に供給して粒子を製造した。この際、噴霧乾燥機に流入される乾燥空気の温度は85℃であった。得られた微細粒子の平均粒径は2.0 μ mであった。

実施例3：微細粒子の製造

ヒト成長ホルモン (hGH) 0.1 mg / ml を含有する5 mM PBS に Tween 80 を0.01重量%の濃度で加えた。これに、分子量2,000,000のヒアルロン酸ナトリウム0.9 mg / ml の濃度で加えた。得られた溶液を3 ml / 分の流速で噴霧乾燥機 (Buchi 190) に供給して微細粒子を製造した。この際、噴霧乾燥機に流入される乾燥空気の温度は85℃であった。得られた微細粒子の平均粒径は2.0 μ mであった。

試験例1：インビトロ放出試験

前記実施例1、2および3で製造した微細粒子を緩衝溶液 (150 mM 塩化ナトリウム、10 mM リン酸塩、0.05% アジ化ナトリウム、pH 7.4) に hGH の濃度が1.0 mg / ml になるまで各々懸濁した。得られた分散液をオーブンに入れ、hGH の放出試験を攪拌機を用いて37℃で行った。一定時間後、分散液を800 x g で10分間遠心分離して全体分散液の1/10に相当する上澄液を分離した。同一量の緩衝液を分散液に加えた後さらに37℃で放出試験を続けた。上澄液におけるhGHの濃度をローリー法および高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定してヒト成長ホルモンの経時放出量を決定した。その結果を図1に示す。

図1は、ヒト成長ホルモン（hGH）のインビトロ経時溶出量の変化を示す。図1から分かるように、ヒト成長ホルモンの放出速度はヒアルロン酸の分子量が大きいほど、そしてhGHの含量が少ないほど遅かった。実際に、実施例3で製造した微細粒子は最も遅い放出速度を示した。この結果から薬物の放出期間はヒ

アルロン酸の分子量、タンパク質含量などの条件によって調節が可能であることが分かる。また、本発明で製造した微細粒子はインビトロ放出の際、初期の急激な放出がなく、70%程度が放出されるまで一定な速度を示すことが分かる。

試験例2：微細粒子中のヒト成長ホルモンの安定性

本発明の微細粒子中のヒト成長ホルモンが微細粒子の製造に用いた水溶液状のヒト成長ホルモンと同一であるか否かを判断するために、インビトロ放出試験において微細粒子から放出されたヒト成長ホルモンを逆相高性能液体クロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）を用いて分析した。

酸化、脱アミド化によるhGHの変性は逆相HPLCによって確認でき、その結果を図2Aおよび2Bに示す。

図2Aおよび2Bは、hGHを含む本発明の徐放性組成物の薬物安定性を逆相高性能液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）を用いて観察した結果を示し、図2Aは、本発明の剤形から溶出されたhGHのRP-HPLCプロフィールであり、図2Bは水溶液hGHコントロールのプロフィールである。

凝集によるhGHの変性はSECで確認でき、その結果を図3Aおよび3Bに示した。

図3Aおよび3Bは、hGHを含む本発明の徐放性組成物の薬物安定性をサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）を用いて観察した結果を示し、図3Aは、本発明の剤形から溶出されたhGHのSECプロフィールであり、図3Bは水溶液hGHコントロールのプロフィールである。

図2A、2B、3Aおよび3Bから分かるように、本発明の組成物から溶出されたヒト成長ホルモンはヒト成長ホルモン水溶液のコントロールと同一であり、hGH単量体の含量は95%以上であった。この結果からhGHは微細粒子組成物の製造課程および37℃での溶出課程中において変性しなかったことが分かる

試験例3：インビボ溶出試験

低い成長ホルモン分泌の遺伝性を有する矮小ラット (dwarf rat) を実験動物として用いて本発明の微細粒子の徐放特性を観察した。

実施例1で製造した徐放性微細粒子をプロピレングリコールとエタノールの7：3の比の混合溶液にヒト成長ホルモンの濃度が5 mg/mlになるまで分散

した。得られた分散液をヒト成長ホルモンの濃度が0.5 mg/mlになるまで緩衝水溶液 (150 mM NaCl、リン酸塩10 mM、pH 7.4) で希釈した。

103 gの平均体重を有する生後7週齢の矮小ラット18匹を各6匹ずつ3群に分離した。第1群の矮小ラットには各々前記で製造した微細粒子分散液0.1 ml (ヒト成長ホルモン50 μ g) を毎日2週間皮下注射で投与した (実験群)。第2群の矮小ラットには水溶液状注射剤形として市販されている公知のユウトロピン[®]を同一な条件で投与した (比較群)。第3群の矮小ラットにはhGHを投与しなかった (非処理対照群)。ラットの体重変化を測定するため体重を毎日測定した。

図4は、実験群、比較群および対照群のラットの平均体重増加の経時変化を比べたものである。

図4から分かるように、実験群のラットは比較群および対照群のラットに比べて2週間の実験期間中遥かに大きな継続的な体重増加を示した。この結果から本発明の微細粒子組成物はその徐放特性のため既存の水溶液状剤形より効力が優れていることが分かる。

試験例4：インビボ溶出試験

実施例2で製造した徐放性微細粒子を綿実油にヒト成長ホルモンの濃度が1.5 mg/mlになるまで分散した。

105 gの平均体重を有する生後7週齢の矮小ラット24匹を各6匹ずつ4群に分離した。第1群の矮小ラットには各々前記で製造した微細粒子分散液0.1 ml (ヒト成長ホルモン150 μ g) を2週間に亘って3日ごとに皮下注射で投

与した（実験群）。第2群の矮小ラットにはユウトロピン^Rを同一な条件で投与した（比較群）。第3群の矮小ラットには50 μ gのhGHに相当するユウトロピン^Rを2週間の間毎日投与した（比較群2）。第4群の矮小ラットにはhGHを投与しなかった（非処理対照群）。ラットの体重変化を測定するため体重を毎日測定した。

図5は、実験群、比較群および対照群のラットの平均体重増加の経時変化を比べたものである。

図5から分かるように、実験群のラットは比較群および対照群のラットより大きな体重の増加を示した。比較群1のラットは注射後1日目には相当な体重増加を示したが、2日および3日目には対照群より体重の増加率が小さかった。実験群と比較群2は継続的な体重増加を示した。この結果から本発明の微細粒子組成物は少なくとも3日間持続される徐放性特性を保っていることが分かる。

試験例5：インビボ溶出試験

実施例2で製造した徐放性微細粒子を綿実油にヒト成長ホルモンの濃度が1.5 mg/mlになるまで分散した。2.5 kgの平均体重を有する8匹のウサギを各4匹ずつ2個の群に分けた。一つの群のウサギには各々ヒト成長ホルモン3,700 μ gを含む微細粒子分散液を注射投与した（実験群）。他の群のウサギにはhGHを投与しなかった（対照群）。

投与後、6日間毎日ウサギの血液サンプルを採取した。

血液サンプル中のhGHの量をRIA（Radio immuno assay）法で定量した。

図6は、血中のヒト成長ホルモン濃度の経時変化を示す。

図6から分かるように、血中ヒト成長ホルモンの量は投与後4日間0ないし11 ng/mlの範囲で維持され、5日以降にはしだいに減少した。この結果から本発明の微細粒子組成物は4日間一定な放出速度を有し、その以降は放出速度がしだいに減少する特性があることが分かる。この結果は、hGHのインビトロ放出速度がhGHの70%が放出されるまで放出速度が一定であるという試験例1の結果と一致した。これとは対照的に、対照群の血中ヒト成長ホルモンの濃度はRIA法の感知濃度以下（1 ng/ml）の無視できる範囲にあった。

実施例4：微細粒子の製造およびインビトロ溶出試験

(段階1) 微細粒子の製造

ウシ成長ホルモン (b S T) 2 m g / m l を含有する 5 m M P B S にツイー
ン 8 0 を 0 . 0 1 重量 % の濃度で加えた。これに、分子量 1 , 0 0 0 , 0 0 0 の
ヒアルロン酸ナトリウムを 2 m g / m l の濃度で加えた。得られた溶液を 3 m l
／分の流速で噴霧乾燥機 (Buchi 1 9 0) に供給して微細粒子を製造した。この
際、噴霧乾燥機に流入される乾燥空気の温度は 8 5 ℃であった。得られた微細粒
子の平均粒径は 3 . 0 μ m であった。

(段階2) インビトロ溶出試験

段階1で製造した微細粒子を用いて試験例1の方法に従ってインビトロ溶出試
験を行い、溶出された b S T の安定性を試験例2の方法に従って調べた。

放出された b S T をサイズ排除クロマトグラフィー法で定量および定性分析を
行った。その結果、b S T は 7 2 時間の間 8 5 % 以上が溶出され、b S T の変性
は起こらなかった。

実施例5：微細粒子の製造およびインビトロ溶出試験

(段階1) 微細粒子の製造

ブタ成長ホルモン (p S T) 2 m g / m l を含有する 5 m M P B S にツイー
ン 8 0 を 0 . 0 1 重量 % の濃度で加えた。これに、分子量 1 , 0 0 0 , 0 0 0 の
ヒアルロン酸ナトリウムを 2 m g / m l の濃度で加えた。得られた溶液を 3 m l
／分の流速で噴霧乾燥機 (Buchi 1 9 0) に供給して微細粒子を製造した。この
際、噴霧乾燥機に流入される乾燥空気の温度は 8 5 ℃であった。得られた微細粒
子の平均粒径は 3 . 0 μ m であった。

(段階2) インビトロ溶出試験

段階1で製造した微細粒子を用いて試験例1の方法に従ってインビトロ溶出試
験を行い、溶出された p S T の安定性を試験例2の方法に従って調べた。

放出された p S T をサイズ排除クロマトグラフィー法で定量および定性分析を
行った。その結果、p S T は 7 2 時間の間 9 0 % 以上が溶出され、p S T の変性
は起こらなかった。

実施例6：微細粒子の製造およびインビトロ溶出試験

(段階1) 微細粒子の製造

顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte macrophage—colony stimulating factor, GM—CSF) 0.4 mg/ml を含有する 5 mM PBS にツイーン80を0.01重量%の濃度で加えた。これに、分子量1,000,000のヒアルロン酸ナトリウムを1.6 mg/mlの濃度で加えた。得られた溶液を3 ml/分の流速で噴霧乾燥機 (Buchi 190) に供給して微細粒子を製造した。この際、噴霧乾燥機に流入される乾燥空気の温度は85℃であった。得られた微細粒子の平均粒径は3.0 μ mであった。

(段階2) インビトロ溶出試験

段階1で製造した微細粒子を用いて試験例1の方法に従ってインビトロ溶出試験を行い、溶出されたGM—CSFの安定性を試験例2の方法に従って調べた。

放出されたGM—CSFをサイズ排除クロマトグラフィー法で定量および定性分析を行った。その結果、GM—CSFは72時間の間92%以上が溶出され、GM—CSFの変性は起こらなかった。

実施例7：微細粒子の製造およびインビトロ溶出試験

(段階1) 微細粒子の製造

エритроポエチン (erythropoietin, EPO) 1000 IU/ml および血漿アルブミン0.5 mg/ml を含有する 5 mM PBS にツイーン80を0.01重量%の濃度で加えた。これに、分子量1,000,000のヒアルロン酸ナトリウムを2.5 mg/mlの濃度で加えた。得られた溶液を3 ml/分の流速で噴霧乾燥機 (Buchi 190) に供給して微細粒子を製造した。この際、噴霧乾燥機に流入される乾燥空気の温度は85℃であった。得られた微細粒子の平均粒径は3.5 μ mであった。

(段階2) インビトロ溶出試験

段階1で製造した微細粒子を用いて試験例1の方法に従ってインビトロ溶出試験を行い、溶出されたEPOの安定性を試験例2の方法に従って調べた。

放出されたEPOをサイズ排除クロマトグラフィー法で定量および定性分析を

行った。その結果、EPOは72時間の間70%以上が溶出され、EPOの変性は起こらなかった。

実施例8：微細粒子の製造およびインビトロ溶出試験

(段階1) 微細粒子の製造

インターフェロン- α (Interferon- α) 2×10^5 IU/mlおよび血漿アルブミン0.2mg/mlを含有する5mM PBSにツイーン80を0.01重量%の濃度で加えた。これに、分子量1,000,000のヒアルロン酸ナトリウムを2.5mg/mlの濃度で加えた。得られた溶液を3ml/分の流速で噴霧乾燥機 (Buchi 190) に供給して微細粒子を製造した。この際、噴霧乾燥機に流入される乾燥空気の温度は105℃であった。得られた微細粒子

の平均粒径は3.5 μ mであった。

(段階2) インビトロ溶出試験

段階1で製造した微細粒子を用いて試験例1の方法に従ってインビトロ溶出試験を行い、溶出されたインターフェロン- α の安定性を試験例2の方法に従って調べた。

放出されたインターフェロン- α をサイズ排除クロマトグラフィー法で定量および定性分析を行った。その結果、インターフェロン- α は72時間の間90%以上が溶出され、インターフェロン- α の変性は起こらなかった。

実施例9：微細粒子の製造およびインビトロ溶出試験

(段階1) 微細粒子の製造

インターフェロン-ガンマ (Interferon- γ) 2×10^5 IU/ml、グリシン0.2mg/mlおよび血漿アルブミン0.2mg/mlを含有する5mM PBSにツイーン80を0.01重量%の濃度で加えた。これに、分子量1,000,000のヒアルロン酸ナトリウムを2.5mg/mlの濃度で加えた。得られた溶液を3ml/分の流速で噴霧乾燥機 (Buchi 190) に供給して微細粒子を製造した。この際、噴霧乾燥機に流入される乾燥空気の温度は105℃であった。得られた微細粒子の平均粒径は3.5 μ mであった。

(段階2) インビトロ溶出試験

段階1で製造した微細粒子を用いて試験例1の方法に従ってインビトロ溶出試験を行い、溶出されたインターフェロン- γ の安定性を試験例2の方法に従って調べた。

放出されたインターフェロン- γ をサイズ排除クロマトグラフィー法で定量および定性分析を行った。その結果、インターフェロン- γ は72時間の間85%以上が溶出され、インターフェロン- γ の変性は起こらなかった。

実施例10：微細粒子の製造およびインビトロ溶出試験

(段階1) 微細粒子の製造

インスリン20 IU/mlを含有する5 mM PBSにツイーン80を0.01重量%の濃度で加えた。これに、分子量1,000,000のヒアルロン酸ナトリウムを2 mg/mlの濃度で加えた。得られた溶液を3 ml/分の流速で噴

霧乾燥機 (Buchi 190) に供給して微細粒子を製造した。この際、噴霧乾燥機に流入される乾燥空気の温度は85℃であった。得られた微細粒子の平均粒径は3.0 μ mであった。

(段階2) インビトロ溶出試験

段階1で製造した微細粒子を用いて試験例1の方法に従ってインビトロ溶出試験を行い、溶出されたインスリンの安定性を試験例2の方法に従って調べた。

放出されたインスリンをサイズ排除クロマトグラフィー法で定量および定性分析を行った。その結果、インスリンは72時間の間95%以上が溶出され、インスリンの変性は起こらなかった。

実施例11：微細粒子の製造およびインビトロ溶出試験

(段階1) 微細粒子の製造

インスリン-類似成長因子2 mg/mlを含有する5 mM PBSにツイーン80を0.01重量%の濃度で加えた。これに、分子量1,000,000のヒアルロン酸ナトリウムを2 mg/mlの濃度で加えた。得られた溶液を3 ml/分の流速で噴霧乾燥機 (Buchi 190) に供給して微細粒子を製造した。この際、噴霧乾燥機に流入される乾燥空気の温度は85℃であった。得られた微細粒子の平均粒径は3.0 μ mであった。

(段階2) インビトロ溶出試験

段階1で製造した微細粒子を用いて試験例1の方法に従ってインビトロ溶出試験を行い、溶出されたインスリンー類似成長因子の安定性を試験例2の方法に従って調べた。

放出されたインスリンー類似成長因子をサイズ排除クロマトグラフィー法で定量および定性分析を行った。その結果、インスリンー類似成長因子は72時間の間90%以上が溶出され、インスリンー類似成長因子の変性は起こらなかった。

比較例1：ゲル剤形の製造およびインビトロ溶出試験

(段階1) 微細粒子の製造

hGH 2.3 mg/ml を含有する5 mM PBS に分子量2,000,000のヒアルロン酸ナトリウムを20 mg/ml の濃度で加えてhGHを含有する2%ヒアルロン酸塩ゲル剤形を得た。

(段階2) インビトロ溶出試験

段階1で製造したゲル剤形を試験例1の方法に従って試験した。その結果、1時間以内にhGH 100%が放出された。この結果からゲル剤形は、水によって容易に希釈されるため本発明の微細粒子より短い時間内に薬物を放出することが分かる。

比較例2：ゲル剤形の製造およびインビトロ溶出試験

(段階1) 微細粒子の製造

hGH 1.5 mg/ml を含有する5 mM PBS に分子量2,000,000のヒアルロン酸ナトリウムを20 mg/ml の濃度で加えてhGHを含有する非流動性ゲル剤形を得た。

得られたゲル剤形1 ml を綿実油2 ml に分散し、均質化してエマルジョンを形成した。

(段階2) インビトロ溶出試験

95 g の平均体重を有する生後7週齢の矮小ラット24匹を各6匹ずつ4群に分離した。一つの群には段階1で製造したエマルジョン0.3 ml (150 μ g のhGH) を皮下注射によって投与した(第1群)。

エマルジョン剤形の効果を他の剤形と比べるために、他の二つの群のラットには、各々実施例2で製造した徐放性微細粒子をヒト成長ホルモンの濃度が $150\mu\text{g}$ になるまで綿実油に分散した分散剤を投与し（第2群）；ヒト成長ホルモン $150\mu\text{g}$ に相当するユウトロピン[®]を投与した（第3群）。残りの群のラットにはヒト成長ホルモン剤形を投与しなかった（対照群）。投与後ラットの体重増加の変化を6日間観察した。

図7は、ヒト成長ホルモンを含む本発明の徐放性剤形および通常の剤形で処理した矮小ラットの平均体重増加の経時変化を比べたものである。結果としては、ヒアルロン酸ゲル剤形で処理した矮小ラットの体重増加の経時変化はユウトロピン[®]と類似であった。ヒアルロン酸ゲル剤形で処理した矮小ラットの体重は投与2日または3日後減少し、以降は無投与対照群ラットの体重と類似であった。しかし、本発明の剤形で処理した群のラットは他の群に比べて6日間150%の体重増加を示した。

比較例3：ナトリウム－カルボキシメチルセルロースを用いた微細粒子剤形の製造およびインビトロ溶出試験

（段階1）微細粒子剤形の製造

hGH $2.0\text{mg}/\text{ml}$ を含有する5mM PBSにツイーン80を0.01重量%の濃度で加えた。これに、ナトリウム－カルボキシメチルセルロース（Na-CMC、中粘度級）を $1.8\text{mg}/\text{ml}$ の濃度で加えた。得られた溶液を $3\text{ml}/\text{分}$ の流速で噴霧乾燥機（Buchi 190）に供給した。この際、噴霧乾燥機へ流入される乾燥空気の温度は 85°C であり、得られた微細粒子の平均粒子は $3.0\mu\text{m}$ である。

（段階2）インビトロ溶出試験

段階1で製造した微細粒子剤形を試験例1と同様な方法でインビトロ溶出試験を行って、その結果を表1に示す。

【表1】

経過時間	0	1	3	5	7	24	48	72	144
hGHの放出量(%)	0	32	40	48	52	57	63	65	65

表1から分かるように、段階1で製造した微細粒子剤形のインビトロ放出の経時変化は本発明の微細粒子の場合と異なる。すなわち、初期1時間の間30%が放出され、以降48時間までまた30%程度が放出され、その後はhGHがほとんど放出されなかった。この結果から、ヒアルロン酸より疎水性が強い天然炭水化物系の高分子をマトリックス物質として用いる場合には、タンパク質薬物とマトリックスとの相互作用によって薬物の放出量が不均衡になり、薬物の変性可能性が非常に高いことが分かる。

(段階3) インビボ溶出試験

段階1で製造した微細粒子を綿実油に分散した。得られた分散剤を生後7週齢の矮小ラットに300 μ gの量で投与し、非投与群を対照群として用いた。ラットの体重増加を7日間観察し、その結果を体重増加の累積値(g)として下記表2に示す。

【表2】

経過日	1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日
無投与群	0.6	0.8	3.3	5.5	7.6	6.7	7.4
Na-CMC剤形投与群	5.2	3.3	6.4	8.3	10.5	9.4	9.0

表2から分かるように、段階1で製造した微細粒子で処理したラットは比較例2においてのヒアルロン酸ゲル剤形と類似な体重増加様相を示した。すなわち、初日にのみ体重の増加を示し、2日目は体重の減少を示した。また、その以降には対照群より体重増加率がさらに低く、最後の7日には対照群と類似な体重増加を示した。この結果からヒアルロン酸と同様にNa-CMCは天然炭水化物系重合体であるが、Na-CMC剤形は本発明のヒアルロン酸微細粒子より遥かに劣る放出特性および力価を有することが分かる。

比較例4：ヒアルロン酸-ベンジルエステルを用いた微細粒子剤形の製造ならび

インビボおよびインビトロ溶出試験

(段階1) 微細粒子剤形の製造

天然ヒアルロン酸およびベンジルアルコールを化学的に反応させてヒアルロン酸-ベンジルエステルを製造した後、hGHを含む微細粒子を下記のように製造した。

hGH 2mg/mlを含む5mM PBSにツイーン80を0.01重量%の濃度で加えた。得られた溶液を3ml/分の流速で噴霧乾燥機 (Buchi 190) に供給して微細粒子を製造した。この際、噴霧乾燥機へ流入される乾燥空気の温度は85℃であった。得られた微細粒子の平均粒径は2.5μmである。

製造された粒子を6%のヒアルロン酸-ベンジルエステルを含有するジメチルスルホキシド (DMSO) に分散した後、得られた分散液を界面活性剤、Arace1 ATM (ICI, U.S.A.) を含有するミネラル油に加えた後、混合物を均質化してマイクロエマルジョンを作った。得られたマイクロエマルジョンは、ミネラル油連続相と、その中に分散されたhGHを含有するヒアルロン酸-ベンジルエステル/DMSO溶液の分散相からなる。

得られたマイクロエマルジョンに酢酸エチルを攪拌しながら加えた後、DMSOを酢酸エチルで抽出し、ヒアルロン酸-ベンジルエステルが硬化してhGH粒子を含有するヒアルロン酸-ベンジルエステル粒子が形成した。得られた最終粒子の大きさは5.5μmであり、hGHの含量は45%であった。

(段階2) インビボ溶出試験

段階1で製造した微細粒子を試験例1と同様な方法で試験し、その結果を下記表3に示す。

【表3】

経過時間	0	1	3	5	7	24	48	72	144
hGHの放出量(%)	0	15	21	23	25	27	28	30	30

表3から分かるように、天然ヒアルロン酸に疎水性を与えたヒアルロン酸-ベンジルエステルを用いることによって製造した微細粒子剤形からのhGHの放出

は初期5時間以後にはほとんどなかった。このようにhGHが放出されない理由はタンパク質薬物(hGH)とヒアルロン酸ーベンジルエステルマトリックスとの相互作用があまりにも強いからである。

(段階3) インビボ溶出試験

段階1で製造した微細粒子を綿実油に分散した。得られた分散液を生後7週齢の矮小ラットにhGHの量が300gになるように投与し、対照群として非投与群を用いた。ラットの体重増加を7日間観察し、その結果を体重増加累積値(g)として下記表4に示す。

【表4】

経過日	1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日
A	1.2	2.3	3.6	5.7	6.6	7.3	8.2
B	3.6	2.7	5.4	6.3	7.1	8.4	8.0

A：対照群

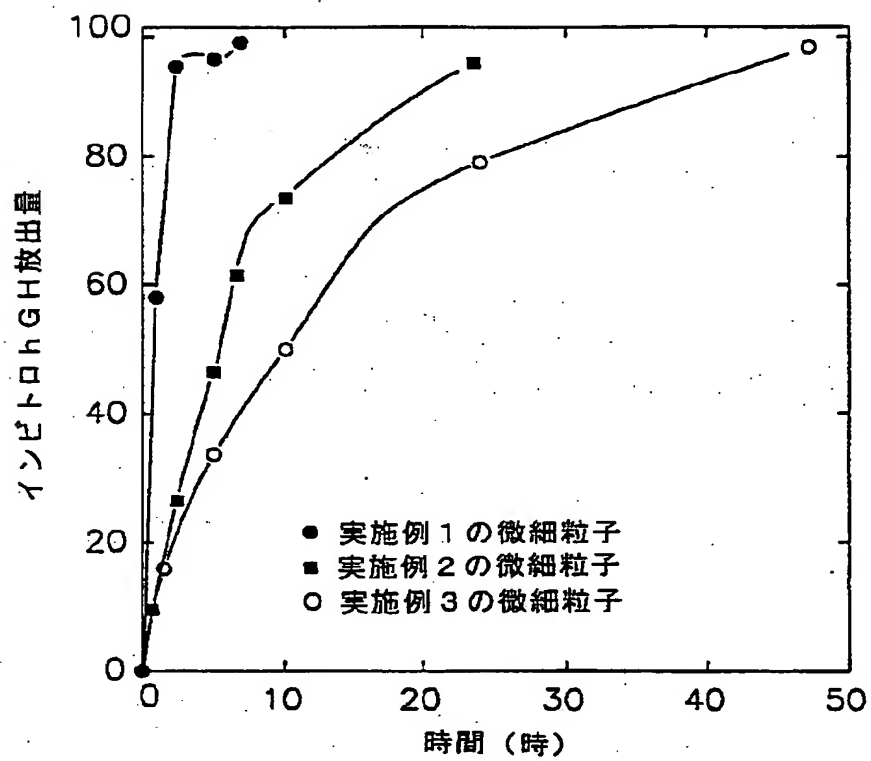
B：ヒアルロン酸ーベンジルエステル微細粒子剤形群

表4から分かるように、ヒアルロン酸ーベンジルエステル粒子剤形は1日以降ほとんど効果がないことが分かる。

本発明を前記特定実施態様と関連して記述したが、添付した特許請求範囲によって定義される本発明の範囲内で、当該分野の熟練者が本発明を多様に変形および変化させ得ることは勿論である。

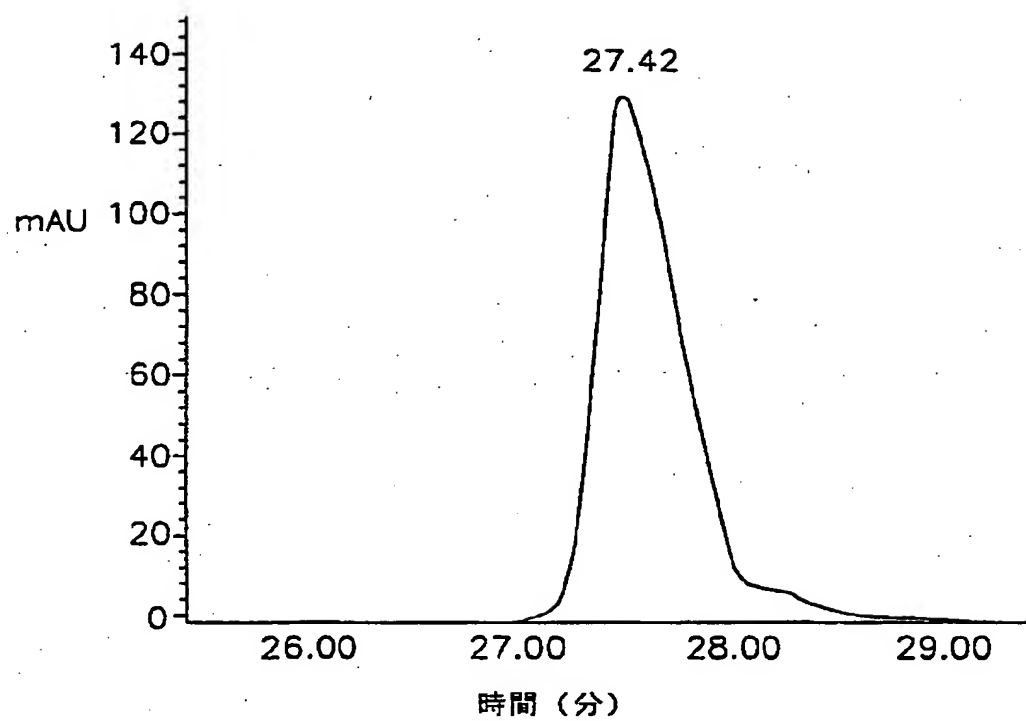
【図1】

図 1



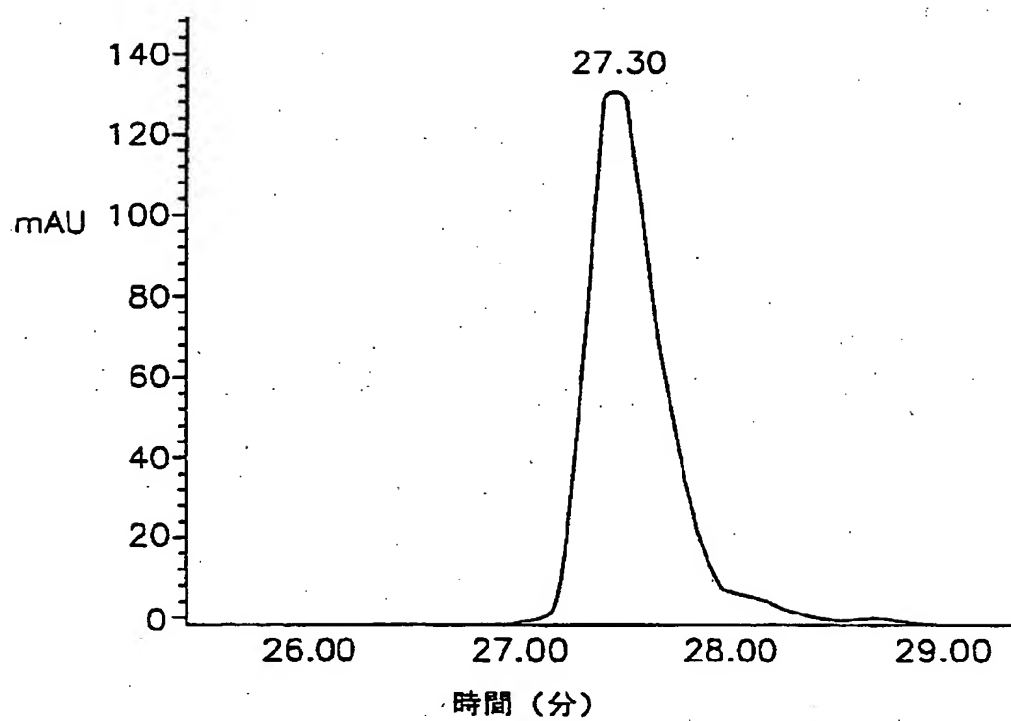
【図2】

図2A

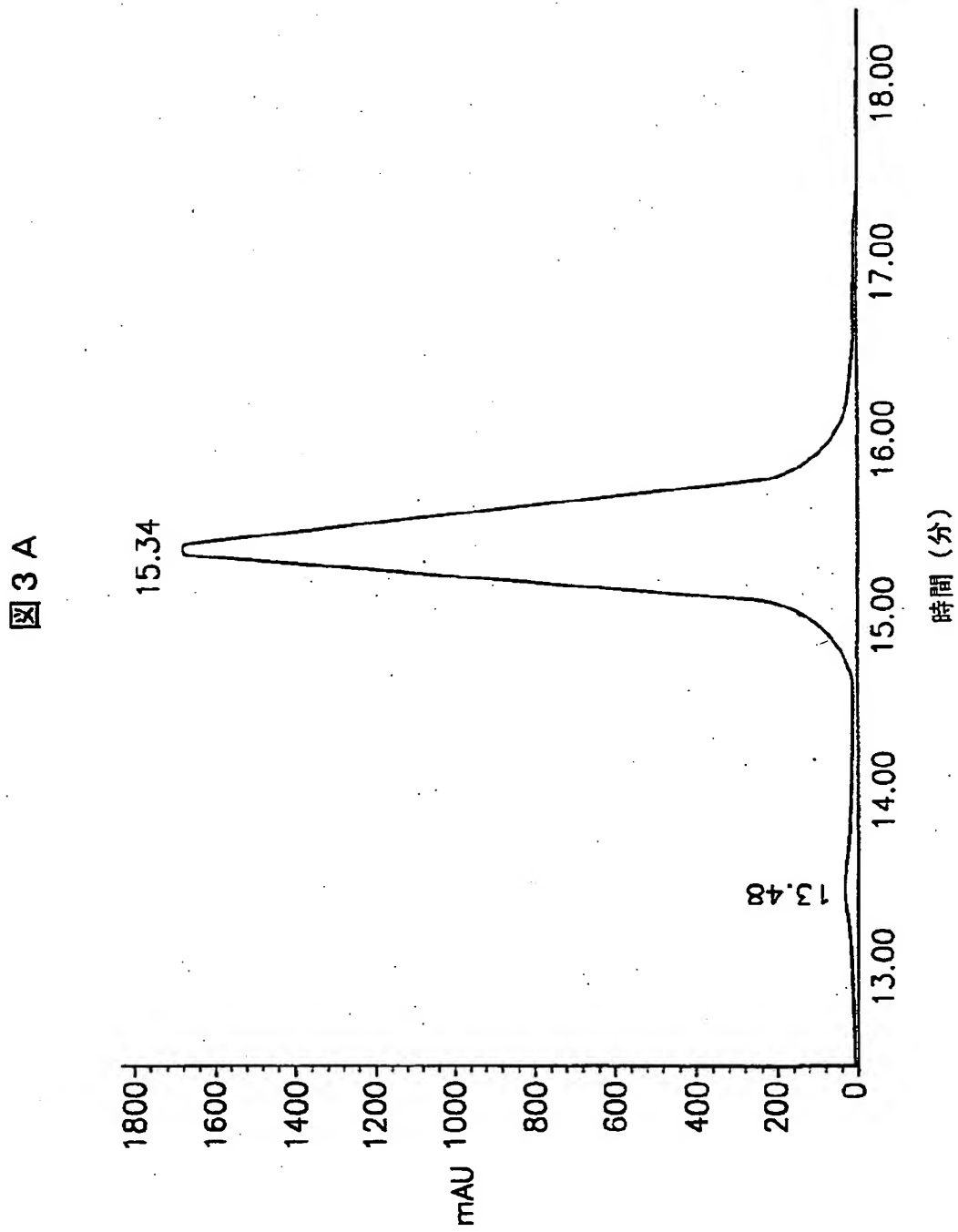


【図2】

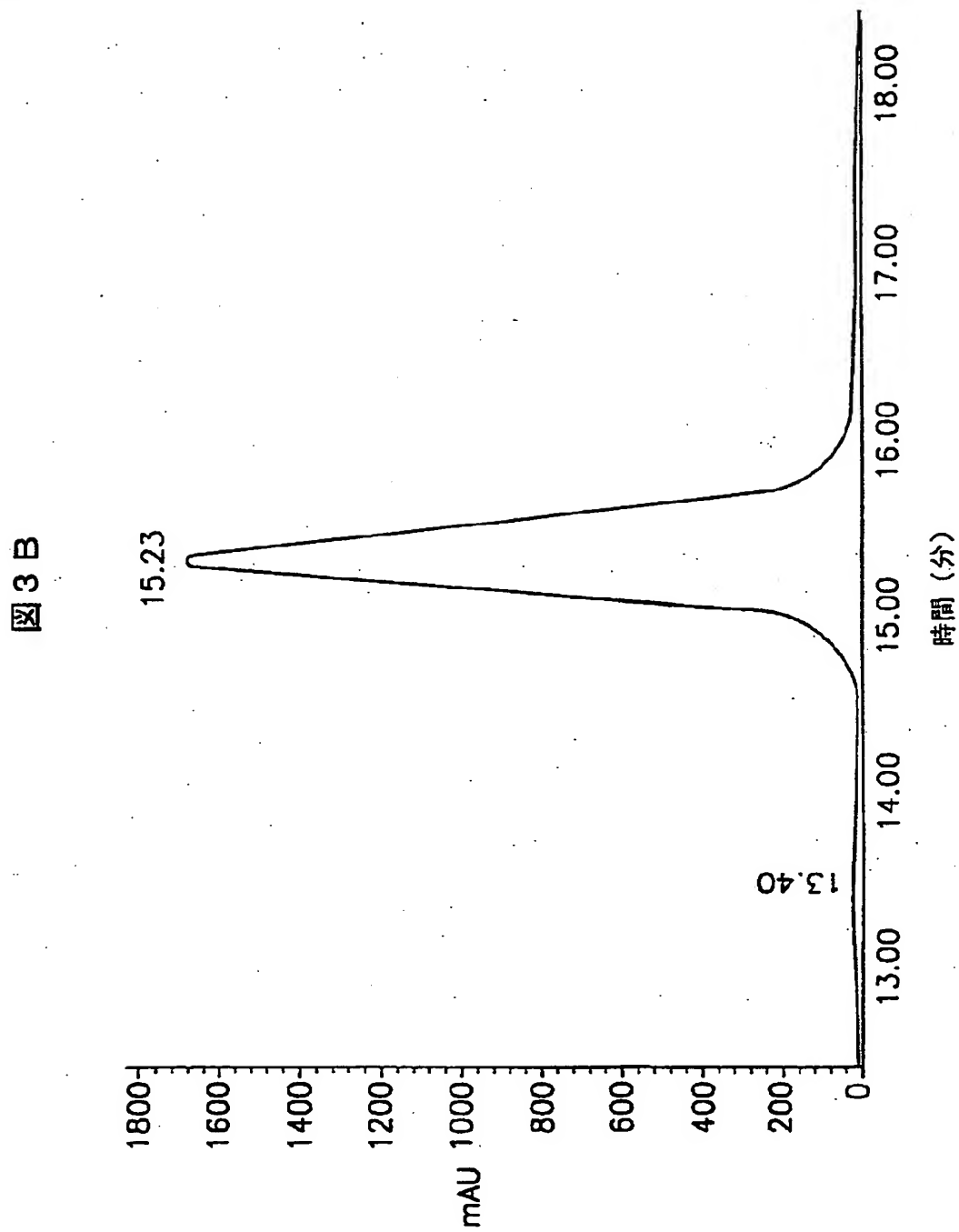
図2B



【図3】

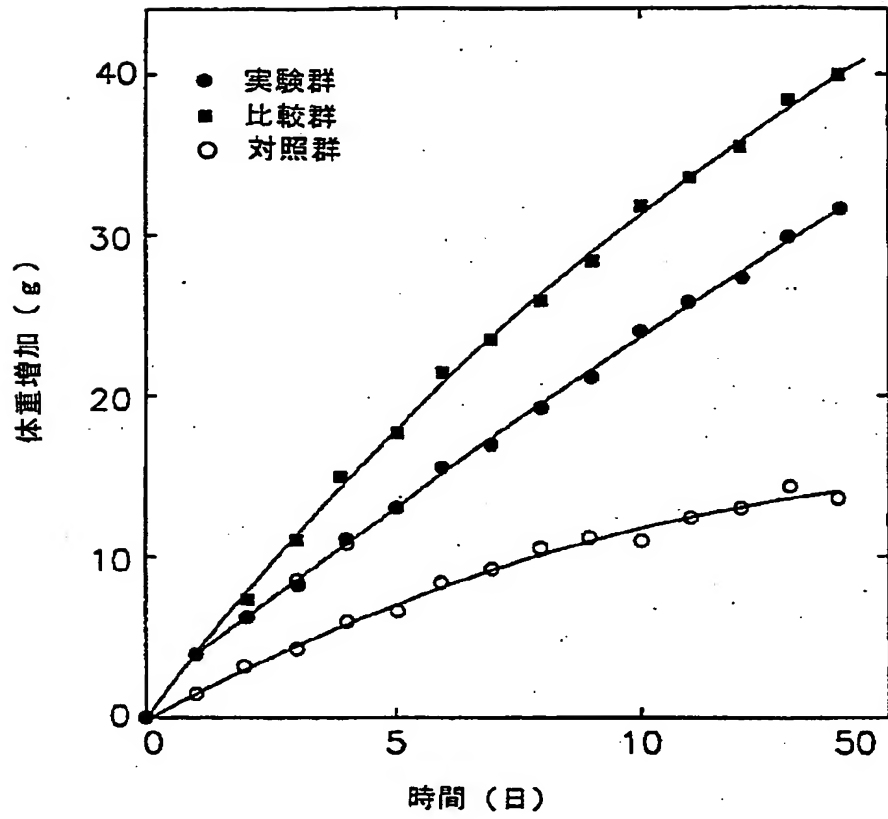


【図3】



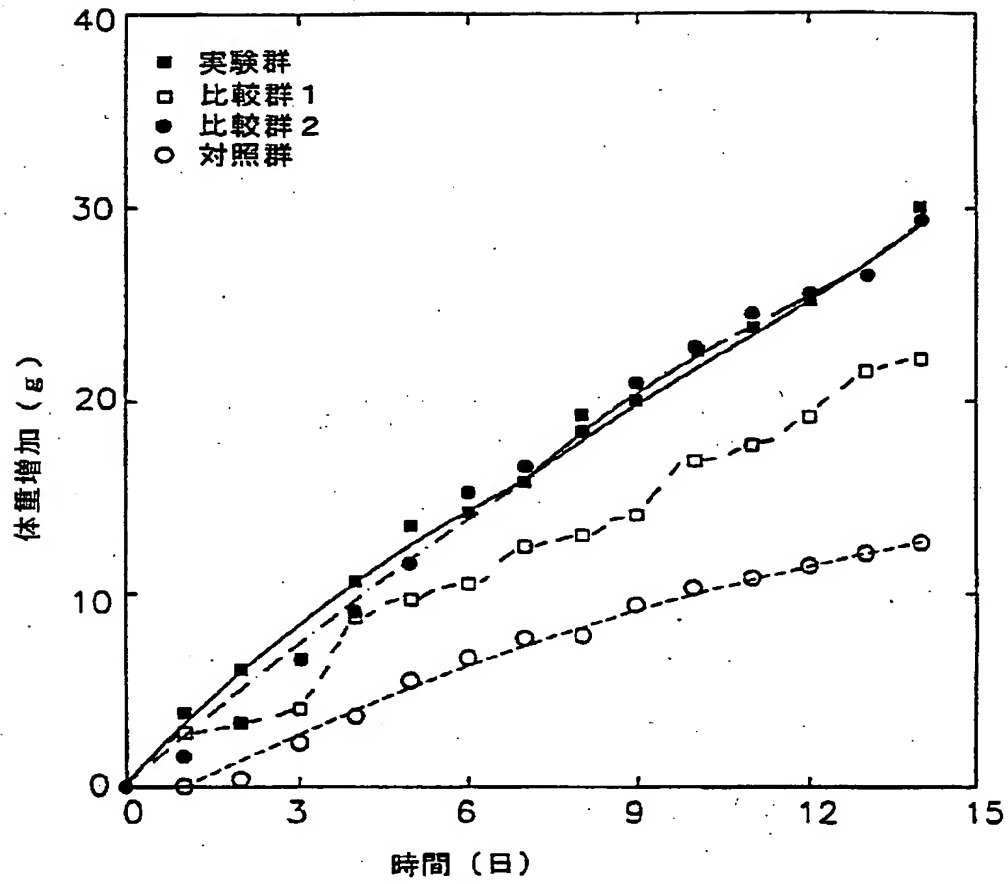
【図4】

図4



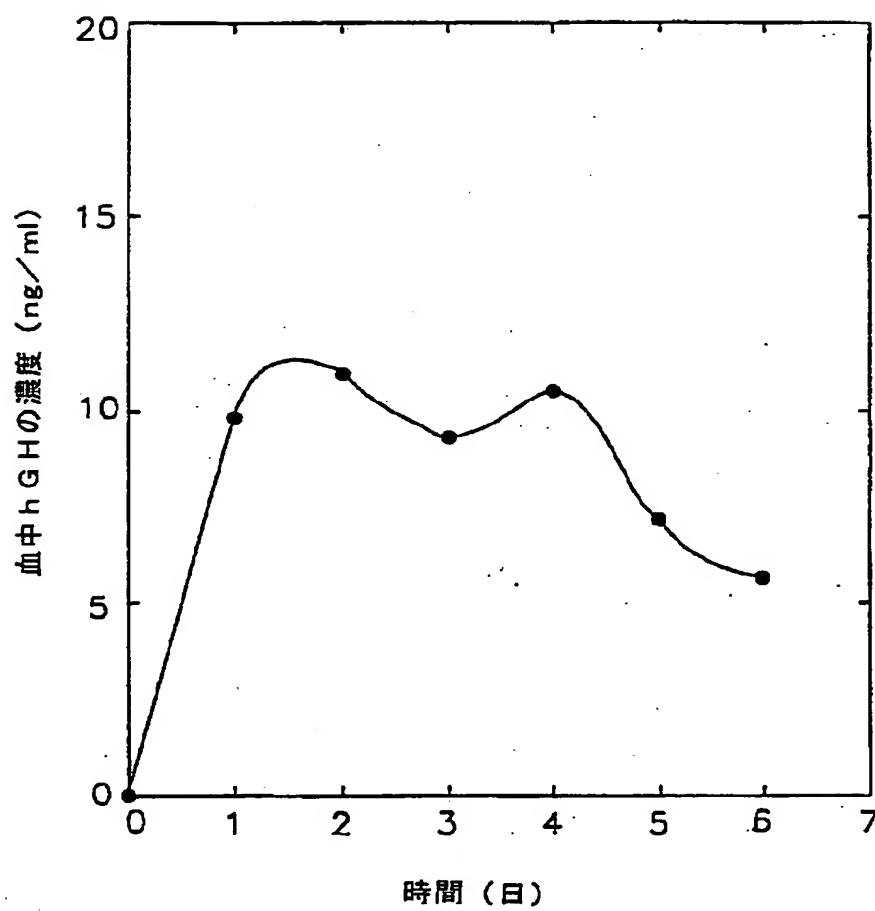
【図5】

図5



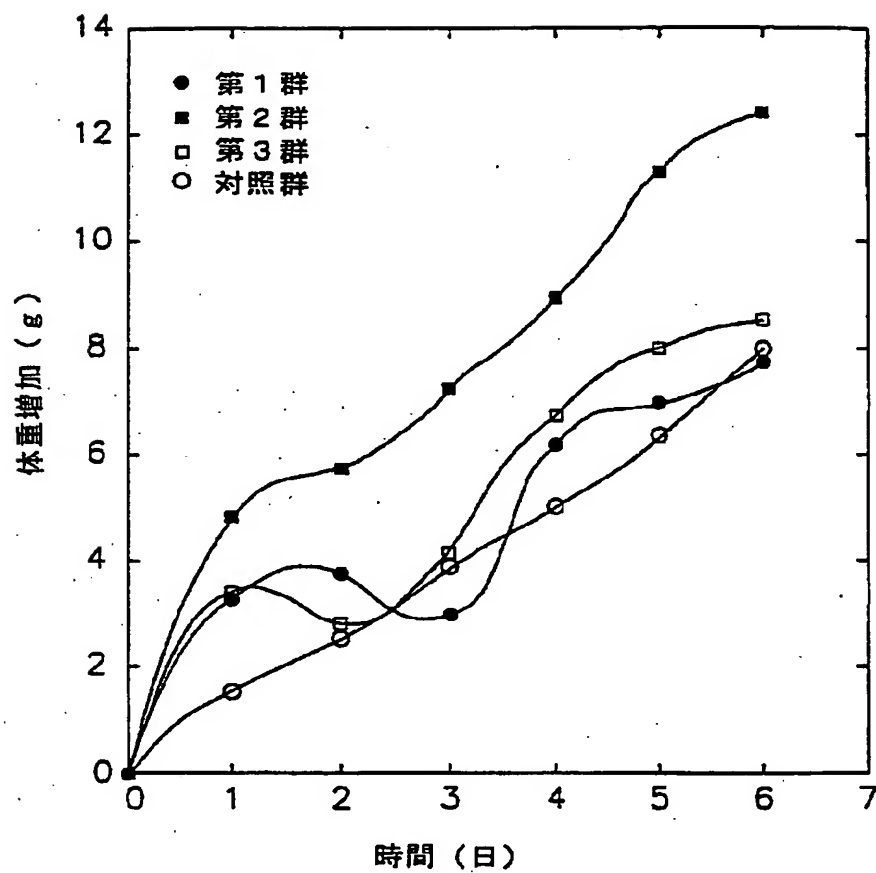
【図6】

図6



【図7】

図7



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR 98/00062

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC ⁶ : A 61 K 38/16, 9/51		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC ⁶ : A 61 K 38/16, 9/51		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
WPI		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Patent Abstracts of Japan, Vol.14, No.63 (C-685), 1990, JP 1-287041 A (ROOMAN KOGYO K.K.), abstract.	1,3
A	Patent Abstracts of Japan, Vol.14, No.123 (C-698), 1990, JP 2-213 A (TAIHO YAKUHIIN KOGYO K.K.), abstract.	1,3

<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
09 June 1998 (09.06.98)		19 June 1998 (19.06.98)
Name and mailing address of the ISA/ AT AUSTRIAN PATENT OFFICE Kohlmarkt 8-10 A-1014 Vienna Facsimile No. 1/53424/535		Authorized officer Wolf Telephone No. 1/53424/436

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
A 6 1 K	38/22	A 6 1 K	37/24
	38/27		37/66
	38/28		37/26
(72)発明者	クォン、オー・リョン		H
	大韓民国305-340デジョン、ユソング、		
	ドリョンドン381-42番、エルジ・アバ		
	ートメント7-305		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.